

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-253099

(43)Date of publication of application : 20.10.1988

(51)Int.Cl.

C07K 15/04
C12N 5/00
C12P 21/00
G01N 33/53
// C12N 15/00
G01N 33/577
(C12P 21/00
C12R 1:91)

(21)Application number : 62-088125

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 10.04.1987

(72)Inventor : HIRAI MAKOTO
TERANO YOSHITAKE
TSURUOKA NOBUO
NAKAZATO HIROSHI

(54) MONOCLONAL ANTIBODY COMPOSED OF NEUTRALIZED HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A monoclonal antibody specific to active site of human tumor necrosis factor (hTNF), unable to form a bond with (a) an hTNF obtained by neutralizing cytotoxicity of hTNF against tumor cell and lost its physiological activity, (b) a tumor necrosis factor of animal other than human and (c) lymphotoxin by immunity reaction, belonging to IgG1 subclass and having L- chain type of isotype κ and isoelectric point of 6.2 ± 0.1 .

USE: A reagent for quantitative determination of hTNF having activity.

PREPARATION: For example, an E.coli transformed with a plasmid containing an hTNF gene is cultured and the produced hTNF is administered to a Balb/c mouse. A spleen cell collected from the immunized mouse is fused with a myeloma cell and the fused cell is screened and cloned to obtain a monoclonal hybridoma. The objective monoclonal antibody is prepared by culturing the hybridoma.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-253099

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)10月20日

C 07 K 15/04
C 12 N 5/00
C 12 P 21/00

8318-4H
B-8515-4B
D-6712-4B ※審査請求 未請求 発明の数 2 (全11頁)

⑮ 発明の名称 ヒト腫瘍壊死因子中和モノクローナル抗体

⑯ 特 願 昭62-88125

⑰ 出 願 昭62(1987)4月10日

特許法第30条第1項適用 昭和62年1月26日発行の「Journal of Immunological Methods, Vol. 96, No. 1, 1987」において発表

⑱ 発 明 者 平 井 誠 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

⑲ 発 明 者 寺 野 由 剛 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

⑳ 発 明 者 鶴 岡 伸 夫 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

㉑ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

㉒ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三 外5名
最終頁に続く

明 細 書

1. (発明の名称)

ヒト腫瘍壊死因子中和モノクローナル抗体

2. (特許請求の範囲)

(A) 下記の性質:

a. ヒト腫瘍壊死因子の腫瘍細胞に対する細胞毒性を中和する;

b. 腫瘍細胞に対する細胞毒性を失った非活性型ヒト腫瘍壊死因子およびヒト以外の動物の腫瘍壊死因子とは、免疫反応で結合しない;

c. リンホトキシンと免疫反応で結合しない;

d. サブクラスがIgG₁であり、L鎖のタイプがアイソタイプκである;

e. 等電点は6.2±0.1である;

を有するヒト腫瘍壊死因子の活性部位に対する特異的モノクローナル抗体。

(B) 組換えDNAにより得られた式I:

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp 1°
Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro 2°
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Glu Trp Leu Asn 3°

Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly 4°
Val Glu Leu Arg Asp Asn Glu Leu Val Val 5°
Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser 6°
Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro 7°
Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile 8°
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Glu Thr Lys 9°
Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro 10°
Cys Glu Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu 11°
Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu 12°
Gly Gly Val Phe Glu Leu Glu Lys Gly Asp 13°
Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp 14°
Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Glu Val 15°
Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu 16°

(1)

のアミノ酸配列で表されるヒト腫瘍壊死因子で感作したマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞とのハイブリドーマから得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

④ MAB-3B10の名称で表される特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

⑤ 特許請求の範囲第1項ないし第3項記載のモノクローナル抗体を用いてヒト腫瘍壊死因子の活性を測定する方法。

⑥ ELISA法である特許請求の範囲第4項記載の方法。

3. (発明の詳細な説明)

(産業上の利用分野)

本発明は、ヒト腫瘍壊死因子(以下、h-TNFと略す)に対する新規な中和モノクローナル抗体に関する。さらに詳しくは、h-TNFと特異的に結合して、h-TNFの細胞毒性に対する中和活性をもち、ヒト由来のリンホトキシンとの結合性をもたないモノクローナル抗体およびその用途に関する。

(従来の技術)

抗腫瘍活性を有する蛋白質として注目されている腫瘍壊死因子(TNF)は、1975年カースウェルらによって、免疫賦活剤で感作した動物の

血清中から殺腫瘍細胞活性あるいは腫瘍死活性を有する物質として見出された(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3666~3670, 1975)。その後、TNFは宿主に大きな影響を及ぼすことなく、種々の腫瘍を壊死させること、また*in vitro*では種々の形質転換した細胞(腫瘍化された細胞)を殺したり生長を止めるのに対し、正常な細胞には影響を与えないことが知られ、抗腫瘍剤或いは抗癌剤として期待されている。TNFは、生体内の活性化されたマクロファージから産生することが報告され(ラフ(Ruff), H. R. およびギフォード(Gifford), G. B., リンホカインズ(Lymphokines), Vol. 2, 235-272, ピック(Pick), E. 編, アカデミックプレス, ニューヨーク, 1981)、近年は株化されたマクロファージ様細胞の培養液からTNF活性を有する物質が分離されている。最近になって二つのグループが、活性化されたヒトマクロファージ様細胞が産生するヒトTNF液

白質のアミノ酸配列を組織換えDNA技術を利用して明らかにした(ペニカ(Pennica) D. ら, Nature, 312:724~729, 1984およびウエング(Wang), A. M. ら, Science, 228:149~154, 1985)。いずれのグループも、活性化したヒトマクロファージ様細胞HL-60からヒトTNFのmRNAを分離し、そのcDNAをクローン化して塩基配列を決定する一方、上記細胞の培養液よりTNFを精製しそのアミノ基末端側のアミノ酸を決定することにより、成熟ヒトTNFは第1図に示すようなVal-Arg-Ser...に始まりカルボキシル基末端はLeuで終わる157個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、その前駆体はさらに76個のアミノ酸からなるポリペプチドが上記ポリペプチドのアミノ末端に付加された蛋白質であるとしている。また、彼らは上記ヒトTNFポリペプチドを形質転換された大腸菌で産生することにも成功している。

ところで、TNFはすでに患者に試用されそ

の臨床学的検討が始まっている。このような状況から、試料中のTNF、特に活性を有する状態にあるTNFを迅速かつ容易に検出する方法の必要性が叫ばれている。例えば、患者にTNFを投与するにあたっては、投与後の血中のTNF濃度を追跡して、最大の投与効果を得るように管理する必要がある。ところが、TNFの測定は、従来、L929細胞に対する細胞毒性を指標とするバイオアッセイで行われており、手間と時間を必要とし、熟練を要する上、大量の検体を処理できないという問題がある。

バイオアッセイの代わりに、免疫化学的にTNFを測定する方法も考えられるが、そのためには、活性を持つTNFのみに特異的に反応する抗体を使用することが必要である。さもないと、変性して失活したTNFが測定され、測定値と実際のTNF活性が一致しなくなるおそれが生じるからである。しかしながら、ヒトTNF(h-TNF)モノクローナル抗体に関しては、活性型h-TNFのみと特異的に反応性をもつモノクローナル抗

体は得られていない。近年、精製したヒトTNFで免疫したマウスの抗体産生細胞を骨髓細胞(ミエローマ)との雑種細胞(ハイブリドーマ)により、ヒトTNFに対するモノクローナル抗体は作製されているが(特開昭60-208924号)、この抗体はh-TNFと反応し、ヒト由来のリンホトキシンとも反応するため、反応特異性において満足すべきものではない。即ち、h-TNF(特に活性型h-TNF)のみと特異的に反応するモノクローナル抗体は、未だ得られていない。

一方、マウスの骨髓細胞と特定抗原に対する免疫化マウスの脾細胞との融合により、試験管内において増殖・複製可能でしかもモノクローナル抗体を産生する雑種細胞(ハイブリドーマ)を作製する方法は、ケーラーおよびミルシュタイン(ネイチャー(Nature), 256, 495-497, 1975)により報告されている。ハイブリドーマは、ある特定の抗原決定基に対してのみ特異性のある均質な抗体(モノクローナル抗

体)を分泌するという性質をもつことから、種々のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが作製され、各種のウイルス抗原や細菌抗原のみならず、細胞表面の分化抗原や癌抗原、さらには生体微量抗原成分の検出や精製のための有用な手段として用いられている。さらに、これら微量抗原成分に対するモノクローナル抗体は、各種の疾患の診断、検査にも有効に利用されている。

ハイブリドーマの一般的な取得方法としては、まず抗原で免疫された哺乳類動物、例えばマウスやラットの脾細胞(Splenicocyte, 以下Sと略す。)とヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損骨髓細胞(Myeloma cells, 以下Mと略す。)とを融合促進剤、例えばポリエチレングリコール1500:PEG1500)の存在下で融合させ、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)を含む培地中で、S-M融合細胞のみをマルチプレート上で増殖させ、M-M融合細胞および遊離Mを死滅させる。次いで、増殖の見られた

ウェルから、目的の抗体を産生する細胞(ハイブリドーマ)を限界希釈法などでクローニングする。つぎに、該ハイブリドーマをin vitroで培養するか、または動物(例えばマウスの腹腔内)に移植培養することにより、特定の抗原に対するモノクローナル抗体を大量に取得することができる。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、h-TNFと特異的に結合してその細胞毒性を中和し、ヒト由来リンホトキシンおよび隣種動物由来のTNFと交叉活性を示さず、また非活性型h-TNFとも交叉反応しない、活性を持つh-TNFに対する特異的なモノクローナル抗体を取得することを目的とする。

本発明は、そのような抗体を使用して、免疫化学的方法、例えばELISA法で、活性を有するh-TNFを選択的に測定する方法を提供することを目的とする。

(問題点を解決するための具体的手段)

本発明の抗体は、h-TNFで免疫された哺乳

動物(好ましくはマウス)から取り出した抗体産生細胞と適当な動物(好ましくはマウス)の腫瘍細胞、例えばミエローマとを融合させ、目的抗体を産生する融合細胞をクローン化して得られるハイブリドーマを培養して製造される。

a) 抗体産生細胞の調製

本発明のハイブリドーマを得るためには、まずh-TNFで哺乳動物を免疫感作する。哺乳動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモット等一般に用いられている動物が使用できる。例えば、マウスに抗原としてh-TNFを腹腔または皮下等に接種することにより免疫する。接種は一回当たり抗原10~30 μ g/マウスを同量のアジュバンドと混和懸濁液として、1~2週間毎に数回繰り返す。最終免疫は抗原をそのまま50~150 μ g/マウス静脈内または腹腔内に注射して、3~4日目に脾臓を摘出し、抗体産生細胞として使用する。h-TNFは、ヒト由来のリンパ系細胞から誘導産生され、精製されたものでも組換えDNA技術によって造成されたh-TNF産生微生物

の培養物から精製されたものでもよい。

b) 骨髓腫細胞の調製

使用する骨髓腫細胞(ミエローマ)に特別の制限はなく、マウス、ラット、ウサギ、ヒト等の動物の細胞株が使用できるが、通常マウスのミエローマ細胞が用いられる。一般的にはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損(HGPRT-)あるいはチミジンキナーゼ欠損(TK-)等の適切な選択マーカーをもったミエローマ等の腫瘍細胞株、例えばP3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8-U1、SP20-Ag14、X63-Ag8-6.5.3を用意する。この腫瘍細胞は8-アザグアニン抵抗性の細胞株で、HAT培地中では生育できない性質をもつ。

c) 細胞融合

培地としてイーグル最小基本培地(MEM)、ダルベッコの改良MEM、ロズウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート(RPMI)1640などの通常使用されているものに10% C

として8-アザグアニン抵抗性株を用いれば、未融合のミエローマ細胞およびM-M融合細胞はHAT培地中では約10日で死滅し、また脾細胞(splenocyte)は正常細胞であるから寿命があり、in vitroでは2週間以上は生育できない。従って、培養10~14日位から生育してくるものは全てS-Mハイブリドーマと考えられる。

e) ハイブリドーマのスクリーニング

スクリーニングは、主にハイブリドーマの増殖したウェルの培養上清を用いたELISA(Enzyme linked-immunosorbent assay)法など公知の方法を用いて目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンをひろいあげることにより行う。

f) クローニング

各ウェル中には、異なる抗体を産生している2種以上のハイブリドーマが生育している可能性があるが、限界希釈法などによりクローニングを行い、最終的に目的のモノクローナル抗体を産生し

S(calif serum)または5%FCS(fetal calf serum)+5%CS、あるいは10%FCSを加える。親細胞の通常の維持は上記のいずれの培地でもよいが、腫瘍細胞の作製には10%FCSが望ましい。細胞融合は、親細胞であるミエローマ等の腫瘍細胞と免疫感作された脾細胞(抗体産生細胞)とを1:5~1:10の割合で混合して融合促進剤の存在下で行われる。融合促進剤としてはHVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)、ポリエチレングリコール(PEG)等を使用する。特に、PEG1500の30~50%程度が良い。

d) ハイブリドーマのHAT選択

融合後の細胞を20%FCS含有RPMI1640培地などで適当に希釈し、マイクロカルチャープレート(通常96ウェルタイプ)に $10^5 \sim 10^6 / 100 \mu\text{l}$ /ウェル程度に植えつける。各ウェルにHAT選択培地を加え、通常1~2日毎に培地の交換を行い培養する。ミエローマ細胞

ている単一性のハイブリドーマを得ることができる。

g) モノクローナル抗体の取得

上記で得られたハイブリドーマを培養容器中(in vitro)または動物体内(in vivo)で培養する。in vitroで培養する場合、培地は先に述べた通常培地にCSまたはFCSを添加したものでよく、この培地で3~5日培養の後、培地上清より目的の抗体を得ることが出来る。in vivoによる培養ではミエローマ細胞と同系の動物にプリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内に投与した後、少なくとも1週間以上経過してから、ハイブリドーマを腹腔内に接種し、7~14日後に貯留してくる腹水を採取し、これより目的の抗体を得ることができる。

このようにして得られるモノクローナル抗体は、h-TNF(特に活性型h-TNF)の測定や検出に利用することができる。TNFのL929細胞に対する細胞毒性は、TNFの主要な指標であ

り、従来、TNFの力価測定はL929細胞を用いたバイオアッセイが行われているが、この方法は高感度である反面、時間がかかり、バイオアッセイ特有の煩雑さがある。そこで、本発明におけるモノクローナル抗体をh-TNFポリクローナル抗体と併用して、迅速かつ簡便な酵素免疫測定法(ELISA)を確立した。ここで用いられるポリクローナル抗体はモノクローナル抗体を得た動物と異なる種由来のh-TNFに特異的な抗体であれば、何れのものでも使用することができる。

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

(実施例)

実施例1 h-TNFモノクローナル抗体の調製

(a) 抗原の調製

TNF遺伝子を含むプラスミドpT4TNFS T8rop- 形質転換された大腸菌株W3110/pT4TNFS T8rop- (特願昭60-217740号)を、テトラサイクリン10 μ g/mlを含むGC培地(2%グリセリン、3%カザミノ

200mMの直線的濃度勾配をもつ塩化ナトリウム溶液を流し、TNF活性画分を得た。この精製工程でも、SDS-PAGEによる解析でほぼ単一のTNF活性を有する蛋白質のバンドが得られたが、さらにこの画分をマトレックスブルーA(アミンコン社製)およびフェニルセファロースCL-4B(ファルマシア社製)カラムにかけることにより精製した。また、上記再クロマトグラフィーによって得られたTNF標品をゲル濾過柱体であるセファクリルS200を用いてさらに純度をあげることができた。

最終的に得られたTNF標品は、マイクロボンドバックC18カラム(ウォーターズ社製)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(島津製作所社製)により精製後、自動アミノ酸分析器(日立製作所社製835-50型)を用い常法に従いアミノ酸分析を行った。その結果、第1図のアミノ酸配列から期待されるアミノ酸組成とよく一致した。

また、上記精製蛋白質のアミノ酸末端のアミノ

酸、0.5%KH₂PO₄、0.2%酵母エキス、0.1%MgSO₄·7H₂O、pH6.5)で37℃、15時間、3 μ l用量(実容量2 μ l)のジャーファメンターを用いて培養した。次に10mMトリス塩酸緩衝液(pH8)(以下単にトリスバッファーと称する)に遠心集菌した菌体を懸濁し、冷却下高圧ホモゲナイザー(Manton-Gaulin Laboratory Homogenizer 15M-8TA)を用い8000psiで破砕した後、遠心し上清を得た。これに硫酸アンモニウムを80%飽和になるよう添加して生じる蛋白質沈澱をトリスバッファーに溶解し、同バッファーに対し充分透析を行った後、DEAEトヨパール650C(東洋曹達社製)カラムクロマトグラフィーにかけた。TNF活性画分は0mMから300mMの直線的濃度勾配をもつ塩化ナトリウム溶液を流すことにより溶出された。続いて、TNF活性画分をトリスバッファー(pH7)で希釈後、DEAEセファロースCL-6B(ファルマシア社製)カラムにかけ、0mMから

濃配列をエドマン法に準じ、気相プロテインシーケンサーModel 470A(Appplied Biosystem社製)を用いて解析した結果、第1図に示すアミノ酸配列と完全に一致していることが認められた。以下、ここで得られたh-TNFをr.h-TNFと呼ぶ。

(b) 動物の免疫

精製したr.h-TNF(10 μ g)をフロインド・コンブリート・アジュバント(PCA)とともに懸濁して4~5週令Balb/cマウス腹腔内に5 μ g/マウス投与した。追加免疫は、2~4週間隔で2回、各々初回免疫と同量のr.h-TNFをフロインド・インコンブリート・アジュバント(PCA)に懸濁してBalb/cマウス腹腔内に5 μ g/マウス投与した。3回目の免疫注射の3週間後にr.h-TNFをリン酸緩衝液(PBS)に溶解し、10 μ g/マウス投与して最終免疫とした。

(c) 細胞融合

最終免疫の3日後にマウスより脾臓を摘出して

編断したのち、ステンレスメッシュで濾過することによって得た脾細胞をマウスミエローマ細胞(P3-X63-Ag8U1:略称P3U1)と4:1で混合し、50%ポリエチレングリコール1540(BDH社製)を用いて細胞融合を行った。10%FCS-RPMI培地にミエローマ細胞として 1×10^5 細胞/μl前後になるように懸濁し、96ウェルマイクロカルチャープレートに100 μl/ウェルずつ分注した。

1日後、HAT培地を各ウェルに100 μlずつ添加し、以後3日ごとに半分量をHAT培地で交換したところ、5日目位からいくつかのウェルにハイブリドーマの生育が認められ、2週間後にはほぼ全ウェルでハイブリドーマが増殖した。

(d) 産生細胞の選定とクローニング

r.h-TNFを0.1M炭酸水素ナトリウムバッファー(pH9.6)で10 μg/μlに調整したものを、96穴マイクロプレート(Costar社製)に100 μl/ウェルずつ分注した。プレートを4℃で一晩放置後、その上清を除去し、ウェ

ル)。

強い抗体活性が認められたウェルについて、限界希釈法によりクローニングを行い、1個のクローンを得、このハイブリドーマの培養によって得られるモノクローナル抗体をMAB-3B10と命名した。

実施例2 h-TNFモノクローナル抗体の反応

特異性の検討

(A) ヒトTNFおよび組換えヒトTNFに対するMAB-3B10の中和活性

MAB-3B10は、組換えヒトTNF(r.h-TNF)で免疫感作したマウスの抗体産生細胞とマウスミエローマとのハイブリドーマより得られたモノクローナル抗体であるので、r.h-TNFとTNF産生細胞(U937細胞:ATCC CRL 1593)の培養上清より精製したh-TNFに対する中和活性を比較検討した。

h-TNFとr.h-TNFを各々10%FCS-MEMで256 U/μlに調整したものをMAB-3B10と等量混合した。4℃で一晩放置後、

ル内の残りの蛋白質結合部位は1%卵白アルブミンを含むPBSでブロッキングした。次に0.1%ツイーン(Tween)20含有PBS(略称PBS-T)で洗浄後、産生細胞培養上清を100 μl/ウェル分注して、37℃で2時間保温後、プレートをPBS-Tで3回洗浄して、アルカリフォスファターゼ標識山羊IgG抗マウスIgG(H)(PL Biochemicals社製、Lot #121-2)の1000倍希釈液を100 μl/ウェルずつ分注した。室温で2時間保温後、PBS-Tで洗浄し、4-メチルアンベリフェリルフォスファターゼ(4-methylumbelliferyl-phosphatase)を1.7 μg/50 μl/ウェルずつ分注した。次いで、室温で10分間保温した後、1M K_2HPO_4 -KOH(pH10.3)を150 μl/ウェル添加して反応を停止させ、反応生成物の蛍光強度をコロナ・マルチスペクトロフルオロメーターを用いて、抗h-TNF抗体の分泌量を測定した(励起波長:λ365nm, 消光波長:λ450nm)。

L929細胞を用いたバイオアッセイにより中和活性をみると両者とも細胞毒性に対する中和活性を示した。さらに詳しく反応性を検討する目的で、h-TNFおよびr.h-TNFを10%FCS-MEMで2,600 U/μlに調整したものを0.5~500 μg/μlの各濃度のMAB-3B10と等量混合し、4℃で一晩放置した後、L929を用いたバイオアッセイにより、両TNFに対するMAB-3B10の中和活性を調べた。結果を第2図に示す。h-TNFに対する中和活性のほう若干強かったが、バイオアッセイにおけるサンプルの蛋白質濃度測定段階での相対的誤差範囲内であり、MAB-3B10のh-TNFとr.h-TNFに対する活性中和反応性はほぼ同程度であった。

(B) 各種TNFのL929細胞毒性作用に対するMAB-3B10の中和活性

ヒトTNF(h-TNF)、組換え型ヒトTNF(r.h-TNF)、マウスTNF(m-TNF)、組換え型マウスTNF(r.m-TNF)、

ウサギTNF (r-TNF) をPBSで各々256単位/mlに調整したものをMAB-3B10またはh-TNFに対するウサギポリクローナル抗体(以下この抗体をPAB-R5と呼ぶ)と等量混合した。4℃で一晩放置後、L929を用いたバイオアッセイ法により、各種TNFのL929細胞毒性に対するMAB-3B10の中和活性を検討した。その結果を第1表に示す。

第1表 各種TNFのL929細胞毒性作用に対するPAB-R5およびMAB-3B10の中和活性

由来の異なる 各種TNF	TNF細胞毒性作用に対する中和活性： 各種TNF 残存活性 (U/ml)			
	PAB-R5		MAB-3B10	
	未処理	処理	未処理	処理
h-TNF	128	<2	128	<2
r.h-TNF	128	<2	128	<2
m-TNF	128	128	128	128
r.m-TNF	128	128	128	128
r-TNF	128	128	128	128

MAB-3B10およびPAB-R5はヒトTNF (h-TNF、r.h-TNF) にのみ中和活性を示し、異種動物(マウス、ウサギ)由来の

TNFに対しては中和活性を示さなかった。

(C) 加熱変性による非活性型h-TNFとMAB-3B10の交叉反応

抗TNF抗体を用いて免疫学的測定法でTNFの力価を測定する場合、特に活性型TNFと非活性型TNFを識別できる抗体を使用することが重要である。そこで、本発明のモノクローナル抗体を使用したELISA法による活性型TNFの力価測定の再現性と有用性を調べる目的で、加熱変性TNF(不活性TNF)がELISA法により交叉反応を示すか検討し、バイオアッセイと比較した。50μg/mlのr.h-TNFをPBS中に調整し、70℃で30、60、90、120および180分間インキュベートした。各時間におけるインキュベート後、各サンプルを直ちに氷冷し、10,000rpm、5分間の遠心分離を行った。次にその上清についてELISA法およびL929細胞を用いた細胞毒性試験を行った。その結果を第3図に示す。ELISA法による結果と、バイオアッセイによる結果は明らかに正の相関性を

示した。MAB-3B10は、70℃の加熱により変性したヒトTNF、つまり不活化したヒトTNFには結合しなかった事実は、MAB-3B10がTNFのL929細胞に対する細胞毒性を中和する活性を有していることと合わせ考えるなら、MAB-3B10はTNFの生物学的活性に因与する部分のみを特異的に認識していることを強く示唆するものである。

(D) ヒト由来リンホトキシンのL929細胞毒性に対するMAB-3B10の中和活性

ヒト由来リンホトキシン(h-LT)および組換え型ヒトリンホトキシン(r.h-LT)をPBS中で各々6,400U/mlおよび10ng/mlに調整し、100μlをウサギ由来抗リンホトキシン抗体(PAB-Rabbit anti-hLT)またはMAB-3B10と等量混合した。4℃で一晩放置後、L929を用いたバイオアッセイにより、各リンホトキシンのL929細胞毒性に対するMAB-3B10の中和活性を検討した。

その結果を第2表に示す。

第2表 h-LTのL929細胞毒性作用に対するMAB-3B10の中和活性

細胞毒性抗原	抗体	L929細胞毒性活性(U/ml)
ヒト由来リン ホトキシン (h-LT)	抗リンホトキシン	未処理 40
		処理 0
	MAB-3B10	未処理 40
		処理 40
組換え型ヒト 由来リンホ トキシン (r.h-LT)	抗リンホトキシン	未処理 20
		処理 0
	MAB-3B10	未処理 20
		処理 20

h-TNFを迅速かつ簡便に測定するために、ウサギh-TNFポリクローナル抗体(PAB-R5)とビオチン標識したMAB-3B10を用いたELISA法の改良について検討した。

コーティング緩衝液(Na_2CO_3 : 1.59 g/l, NaHCO_3 : 2.93 g/l, pH 9.6)を用いてPAB-R5を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したのち、96穴マイクロカルチャープレートに100 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注した。4℃で一晩放置後、上清を除き、1%卵白アルブミンを含むPBSを150 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し、37℃で1時間静置した。種々の濃度に調製したTNFをPAB-R5でコーティングしたプレートに100 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し37℃で2時間反応させた。0.1%ツィーン(Tween) 20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄後、ビオチン標識したMAB-3B10(2,000倍希釈液)を100 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し、37℃で2時間反応させた。次いで、PBS-Tで3回洗浄後、ストレプトアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ(Amersham

MAB-3B10はヒト由来リンホトキシンおよび組換え型リンホトキシンに対して、全く中和活性を示さなかった。

実施例3 モノクローナル抗体の物理化学的性質

以下の物性測定は、実施例1で精製したモノクローナル抗体(MAB-3B10)を用いて行った。

1) 抗体のクラスとアイソタイプ

MAB-3B10のクラスとアイソタイプを1.5%福懸アガロースゲルを用いた免疫電気泳動法で調べたところ、サブクラスはIgG₁であり、L鎖のタイプは κ 鎖を持つ抗体であった。

2) 等電点

等電点をpH範囲3.5~9.5の福懸ポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動法で測定した。その結果MAB-3B10の等電点は6.2 \pm 0.1であった。

実施例4

酵素免疫測定法(ELISA)によるh-TNFの測定

社製: 1,000倍希釈液)を100 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し、室温で1時間反応させた。この混合液にo-フェニレンジアミン(0.43 mg/ml , pH 4.8)と H_2O_2 (0.002%)を0.1Mクエン酸バッファー中に調製したもの200 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 添加し、暗所、室温で30分間反応させた。反応は3Mの H_2SO_4 を50 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 添加して停止させた。吸光度をダイナテック・マイクロライザオートリーダー(490nm)で測定した。第4図に示すように2~60 ng/ml の範囲で濃度依存的にh-TNFを検出できた。このことから、測定感度はL929を用いるバイオアッセイの場合とほぼ同程度であることがわかり、従ってこの方法により未知試料中のTNFを迅速かつ確実に検出できることを確認した。

(発明の効果)

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトTNFの細胞毒性に対して中和活性をもち、また非毒性型TNFおよび異種動物TNFには結合せず、さらにヒト由来リンホトキシンと交叉反応を示さない。

即ち、生物学的活性をもつヒトTNFのみにだけ反応するので、ヒトTNFの活性を従来の煩雑なバイオアッセイに変えて容易に測定することが可能となる。例えば、ポリクローナル抗体と共に用いて、ELISAにより、特定のヒトTNFだけを検出することが出来る。また、本発明におけるヒトTNFに特異的なモノクローナル抗体を利用して、ヒトTNFの精製、免疫学的定量を行うことも可能である。

4. (図面の簡単な説明)

第1図はヒトTNFのアミノ酸配列を示す配列図であり、

第2図はヒトTNFおよび組換え型ヒトTNFの細胞毒性に対するMAB-3B10の中和活性のグラフであり、

第3図は加熱変性したヒトTNFのバイオアッセイおよびELISAによる検量曲線グラフを示し、

第4図はポリクローナル抗体(PAB-R5)とMAB-3B10を併用したELISAによる

ヒトTNFの標準曲線グラフを示す。

特許出願人

サントリー株式会社

代理人

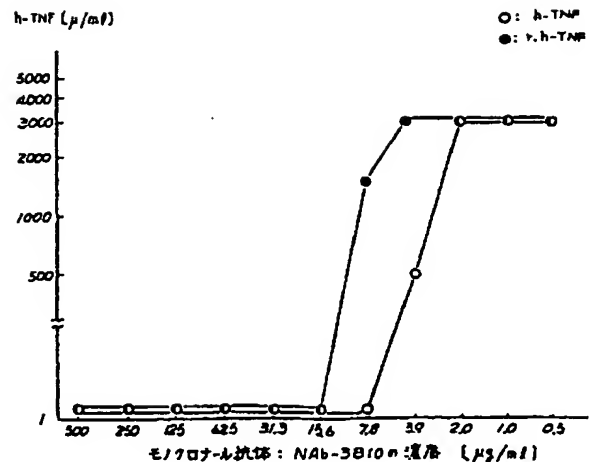
弁理士 橋本 森三

外5名

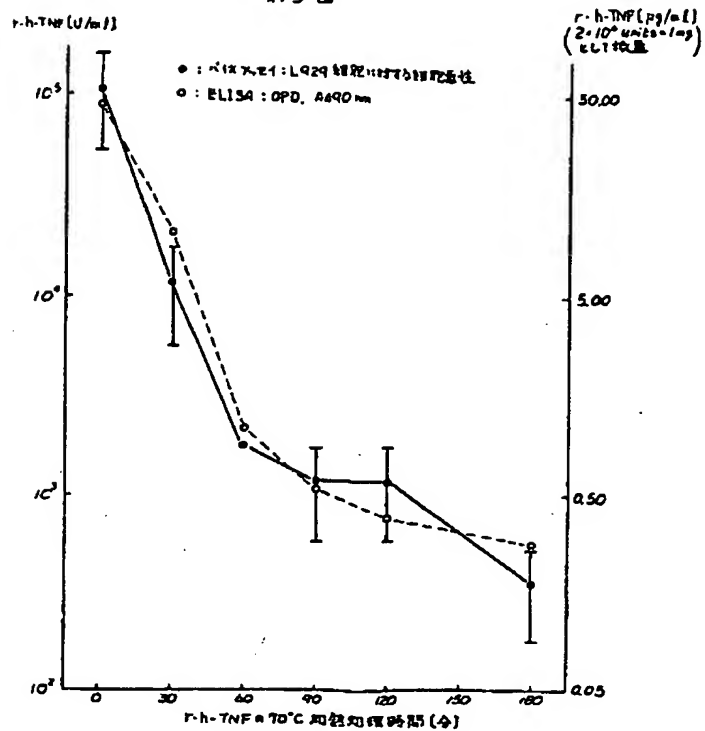
第1図

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro	10	20
Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	30	40
Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	50	60
Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	70	80
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	90	100
Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	110	120
Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	130	140
Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu				150	157

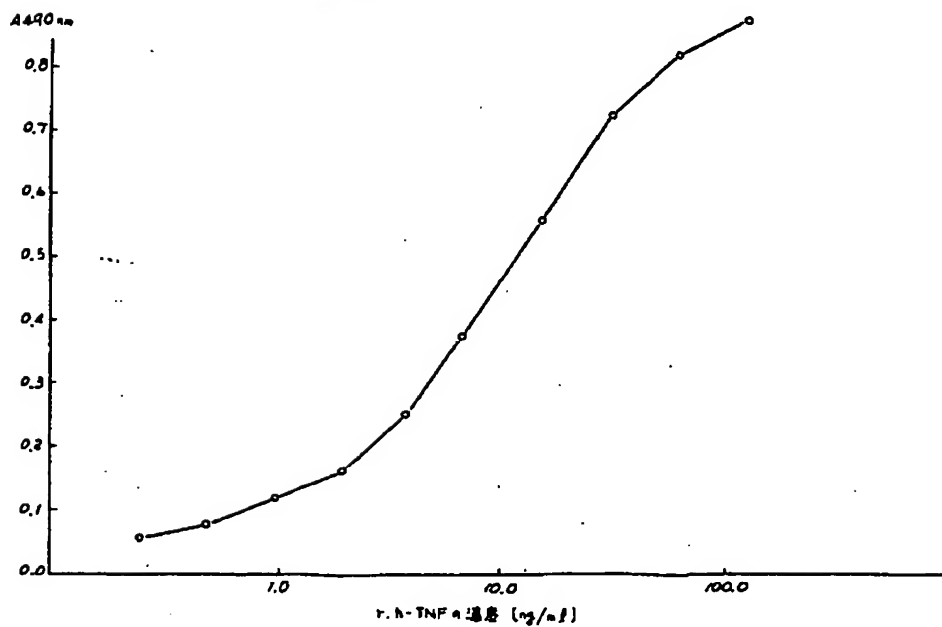
第2図



第3図



第4図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. ⁴

G 01 N 33/53
// C 12 N 15/00
G 01 N 33/577
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

D-7906-2G
C-8412-4B
B-7906-2G

⑥ 発 明 者 中 里

紘 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー株
式会社生物医学研究所内